

Efeito do 2,4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby)

Iulla Naiff Rabelo de Souza Reis¹, Osmar Alves Lameira² e Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro³

Introdução

O paricá, preferencialmente propagado por semente, é uma espécie rústica pouco exigente em adubação e de fácil adaptabilidade, conforme relatado por Melo *et. al* [1], razão pela qual vem sendo bastante utilizada em diferentes modalidades de plantio no estado do Pará. No entanto, há grande variação de crescimento e de produtividade nesses plantios devido, principalmente, a ausência de material genético melhorado. Nesse sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando definir metodologia de micropropagação da espécie com vistas ao melhoramento dos plantios. A regeneração das plantas *in vitro*, diretamente a partir do explante ou através do cultivo de calos, pode ser uma alternativa para propagação deste material de qualidade.

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações [2].

Tem sido sugerido que as auxinas são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais expressando a totipotência das células competentes. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais comumente utilizada para a indução de calos. É também a auxina mais ativa, podendo substituir a auxina natural ácido indolacético (AIA) em meios de cultura, pois esta última é rapidamente oxidada [3].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a indução de calos *in vitro* em paricá a partir de segmentos apicais e intercotiledonares inoculados em meio de cultura suplementado de 2,4-D, visando a embriogênese somática.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental (Belém/PA). Os explantes utilizados foram segmentos apicais e intercotiledonares de plântulas de paricá germinadas *in vitro*.

Os tratamentos testados foram provenientes da combinação do tipo de explante (apical ou

intercotiledonar) com concentrações de 0; 2; 4 e 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D. O meio de cultura básico MS [4] teve as concentrações de NH₄NO₃ e Fe-EDTA reduzidas a metade (os demais componentes em suas concentrações normais), sacarose (3%), ágar (0,8%), e suplementado com o antioxidante polivinilpirrolidone (PVP) (0,1%).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) e/ou HCl (ácido clorídrico) em solução de 0,5 N. Os meios de cultura foram distribuídos na quantidade de 10 ml por tubo de ensaio de 20 x 150 mm. A autoclavagem foi realizada a 120°C e 1,2 atm, durante 20 minutos. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, com auxílio de placas de Petri e pinças esterilizadas em autoclave durante 20 minutos. Após a inoculação dos explantes, os tubos de ensaio foram tampados com papel alumínio e vedados com parafilme. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento na temperatura de 24 ± 1°C.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 2 (quatro concentrações de 2,4-D e duas fontes de explante), com cinco repetições, totalizando 40 unidades experimentais, sendo que cada parcela constou de quatro tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

A avaliação do experimento foi realizada aos 30 dias de cultivo, onde observou-se o percentual de explantes com calos, a textura dos mesmos (friáveis ou compactos), a coloração, a porcentagem de oxidação, o número de raízes que se formaram a partir dos calos e a cobertura de calos no explante, levando em consideração as seguintes notas: 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste SNK ao nível de 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar.

Para a análise estatística os dados de percentual de explantes com calos e oxidação foram transformados para $\arcseno (Y/100)^{1/2}$ e número de raízes que se formaram a partir dos calos foram transformados para $(Y+0.5)^{1/2}$.

Resultados e Discussão

A formação de calos iniciou-se a partir do 8º dia de cultivo nos segmentos intercotiledonares (exceto o

1. Mestranda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530. Bolsista CAPES. E-mail: naiff_agro@yahoo.com.br.

2. Orientador/Pesquisador, Dr. da Embrapa Amazônia Oriental. Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/nº, Caixa Postal 48, Belém-PA, CEP 66095-100.

3. Doutoranda em Sistemas Agroflorestais. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

tratamento com 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D), e a partir do 11º dia nos segmentos apicais. Observou-se que houve maior formação de calos nos tratamentos sem adição de regulador de crescimento para ambos os segmentos utilizados, entretanto, para segmentos apicais não houve diferença estatística entre o controle (90 %) e os tratamentos com 2 mg.L⁻¹ (71 %) e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D (85 %); e para segmentos intercotiledonares, o controle (95 %) e o tratamento com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (80 %) não diferiram estatisticamente entre si. Por outro lado, ao se utilizar 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D, não houve calogênese em segmentos intercotiledonares e somente 5 % dos segmentos apicais formaram calos. Não foi verificada diferença significativa entre os explantes utilizados (Fig. 1).

No trabalho realizado por Rahim *et al.* [5] com *Eucalyptus camaldulensis*, os segmentos nodais inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento, não formaram calos e morreram. Por outro lado, Soares [6] observou que 30 % dos segmentos nodais de ingazeiro (*Inga vera*), mesmo na ausência deste regulador, formaram calos. Mesquita [7] também constatou que houve a formação de apenas 35 % de calos em folhas de lechiera (*Litchi chinensis*) quando não houve suplementação de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Segundo Sahoo *et al.* [8], concentrações entre 0,5 a 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D não foram eficientes para a formação de calos em explantes foliares de amoreira (*Morus indica*), enquanto que para o paricá ficou evidente que na presença de tais concentrações há calogênese. A ocorrência de calos com maior volume foi obtida quando se utilizaram as concentrações de 2 e 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D respectivamente em explantes foliares de lechiera. Nesta espécie somente o uso da concentração de 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D inibiu a formação de calos [7].

No que se refere aos segmentos apicais inoculados em meio MS sem adição de 2,4-D, estes apresentaram 75 % da área do explante coberta por calos, entretanto não diferiram estatisticamente do tratamento em que se utilizou 2 e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D. A concentração de 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D foi a menos eficiente (Fig. 2). O mesmo ocorreu com segmentos intercotiledonares, os quais apresentaram 85 % de cobertura com calos, não diferindo estatisticamente da concentração de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Nos dois tipos de explante não houve calogênese quando se adicionou ao meio 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Somente na concentração de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D verificou-se diferença significativa entre os dois explantes utilizados (Fig. 2).

De acordo com Nogueira [9], a concentração de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentou a maior percentagem de área coberta por calos (90 %) em *Byrsonima intermedia* A. Juss. Da mesma forma, Soares [6] verificou que explantes de segmentos foliares de ingazeiro apresentam maior percentagem de formação de calos (90 %) e percentagem da área do explante coberta por calos (40 %) na presença de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Segmentos intercotiledonares inoculados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento apresentaram o maior número de raízes (1,51 raízes por explante em média), no entanto não se observou diferença estatística em relação aos segmentos apicais (Fig. 3B). O menor número de raízes foi verificado em segmentos apicais e

intercotiledonares submetidos a 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Somente quando se utilizou 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D foi observada diferença significativa entre as duas fontes de explantes, apresentando em média 1,13 raízes por segmento intercotiledonal e 0,82 raízes por segmento apical (Tab. 1). Vale ressaltar que através de análise histológica evidenciou-se que as raízes originaram-se do calo, não apresentando comunicação vascular com explante. O uso de 2,4-D isoladamente na concentração de 6,4 mg.L⁻¹ induziu calogênese e rizogênese em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), produzindo calos de aspecto friável e coloração amarelada, conforme relatou Paiva-Neto [10], ao contrário do que aconteceu no presente estudo, em que a concentração de 6 mg.L⁻¹ reduziu a produção de calos e de raízes.

Observou-se de uma forma geral que os calos apresentaram uma coloração bege claro até os 15 dias (Fig. 3A) após a inoculação dos explantes, tornando-se bege médio aos 30 dias de cultivo, com exceção de segmentos intercotiledonares na presença de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D, que apresentaram coloração bege escuro (Tab. 1). Quanto a textura, segmentos apicais formaram calos friáveis, enquanto que segmentos intercotiledonares formaram calos compactos. Verificou-se que segmentos intercotiledonares inoculados em meio MS com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D apresentaram a maior taxa de oxidação, com 46,5 %, enquanto que ao se utilizar 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D em segmentos apicais não houve a presença de oxidação, contudo não diferiu estatisticamente das outras concentrações utilizadas, e nem de segmentos intercotiledonares expostos a mesma concentração de 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Tab. 1).

Referências

- [1] MELO, J. E. de; CARVALHO, G. M. de; & MARTINS, V. A. 1989. Espécies madeiras substitutas do mogno (*Swietenia macrophylla* King.). Brasília: IBAMA. 16 p. (Série Técnica, 6).
- [2] VENTURIERI, G.A. & VENTURIERI, G.C. 2004. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). *Acta amazônica*, 34 (4): 507-511.
- [3] SANTOS, M.R.A. dos. 1998. *Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em Smilax japecanga Grisebach*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPA, Belém.
- [4] MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 1: 437-496.
- [5] RAHIM, F.; JABEEN, M. & ILAHI, I. 2003. Mass Propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. [Online]. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2 (2): 184-187. Homepage: <http://www.ansinet.org/fulltext/ajps/ajps22184-187.pdf>.
- [6] SOARES, G. de A. 2003. *Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (Inga vera Willd. Subsp. Affinis (DC) T. D. Penn)*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPA, Belém.
- [7] MESQUITA, A.C. 1999. *Estabelecimento in vitro de lechiera (Litchi chinensis Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPA, Belém.
- [8] SAHOO, Y.; PATNAIK, S.K. & CHAND, P.K. 1997. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. *Scientia Horticulturae*, 69 (1/2): 85-98.
- [9] NOGUEIRA, R.C. 2003. *Propagação in vitro, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (Byrsonima intermedia A. Juss.)*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFPA, Belém.

[10] PAIVA NETO, V.B. 1996. *Comportamento in vitro de tecido foliar e segmento nodal de moreira (Chlorophora tinctoria (L.) Gaudichaud)*. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, UFLA, Lavras.

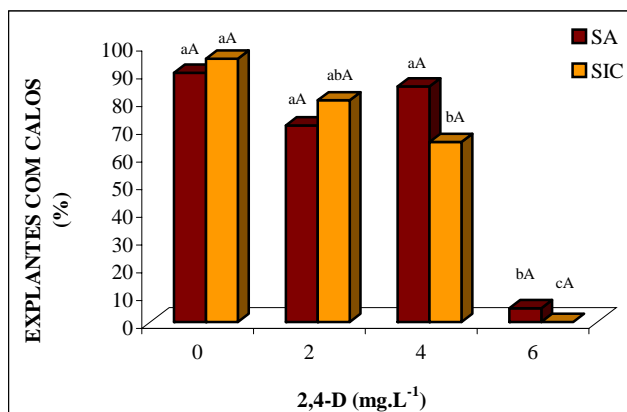


Figura 1. Calogênese em explantes de paricá (*S. parahyba*) expostos a diferentes concentrações de 2,4-D. Médias seguidas por letras distintas entre si comparam minúsculas, as concentrações de 2,4-D; e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SIC – segmento intercotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste de SNK.

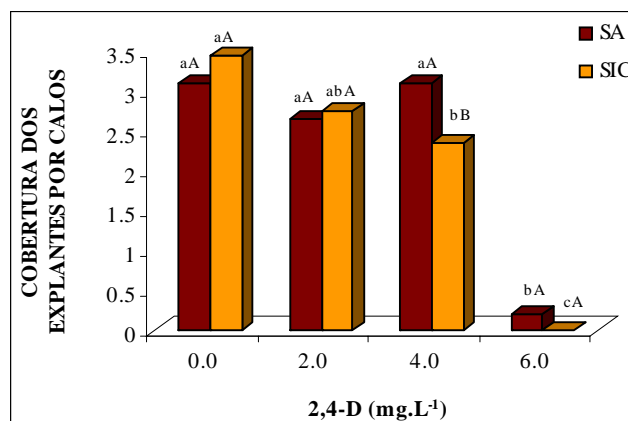


Figura 2. Cobertura de calos nos explantes de paricá (*S. parahyba*) expostos a diferentes concentrações de 2,4-D. Médias seguidas por letras distintas entre si comparam minúsculas, as concentrações de 2,4-D; e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SIC – segmento intercotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste de SNK.

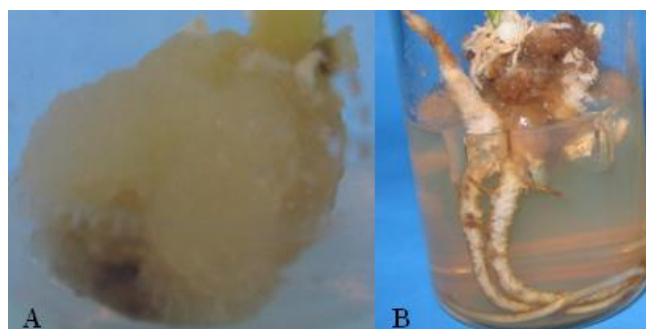


Figura 3. (A) Formação de calos friáveis aos 15 dias de cultivo, com coloração bege claro, a partir de segmento apical de plântulas de paricá (*S. parahyba*) germinadas *in vitro*; (B) Rizogênese a partir de calos de segmentos intercotiledonares de plântulas de paricá (*S. parahyba*) aos 30 dias de cultivo.

Tabela 1. Respostas de variáveis qualitativas e número de raízes em calos de segmentos apicais e intercotiledonares de calos de paricá (*S. parahyba*) germinados *in vitro* expostos diferentes concentrações de 2,4-D.

Concentrações de 2,4-D (mg.L ⁻¹)	Nº de raízes		Coloração*		Textura**		Oxidação (%)	
	SA	SIC	SA	SIC	SA	SIC	SA	SIC
0	1,25aA	1,51 aA	BM	BM	CF	CC	15 aA	4,0 bA
2	0,99 abA	1,09 bA	BM	BM	CF	CC	10 aB	46,5 aA
4	0,82 bB	1,13 bA	BM	BE	CF	CC	11,25 aA	19,5 abA
6	0,77 bA	0,71 cA	SO	SO	SO	SO	0 aA	6,5 bA

Médias seguidas por letras distintas entre si comparam; minúsculas, as concentrações de 2,4-D e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SIC – segmento intercotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste de SNK. * BM (bege médio); BE (bege escuro); SO (sem observação); ** CF (calos friáveis); CC (calos compactos).